

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Experiencia Argentina de Diagnóstico Genético Preimplantatorio (PGD) con Biopsia de Trofoblasto

Coco, Roberto\*; Coco, Fabián; Mincman, Judith; Mondadori, Andressa; Montel Mendonza, Gabriela; Santomé, Matías; Altamirano, Belén; Gismondi, Fernando; Neuspiller, Nicolás

Fecunditas Instituto de Medicina Reproductiva afiliado a la UBA

**Contacto:** Roberto Coco, Roberto; Fecunditas Instituto de Medicina Reproductiva afiliado a la UBA; robercoco@gmail.com

## Resumen

**Introducción:** existen varios tipos de biopsia embrionaria. La mayor experiencia se tiene con la biopsia en pre-embriónes clivados de día 3, la cual está siendo reemplazada por la biopsia de blastocisto por sus ventajas. **Objetivo:** documentar la experiencia lograda con diagnóstico preimplantatorio en biopsia de blastocisto y transferencia diferida al ciclo estimulado para parejas con riesgo genético aumentado y otros motivos médicos. **Materiales y Métodos:** se realizaron 269 ciclos de diagnóstico preimplantatorio en 161 parejas, quienes fueron divididas en: trastornos monogénicos, reordenamientos balanceados, screening de aneuploidías embrionarias, tipificado para histocompatibilidad y selección de pre-embriónes con factor Rh negativos en mujeres altamente sensibilizadas. Los estudios genéticos fueron abordados por mini secuenciación, arreglos de hibridación genómica comparada y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa fluorescente. Un blastocisto sin mutaciones fue transferido al útero a los 30/60 días del ciclo estimulado. **Resultados:** de 850 blastocistos estudiados 334 (39 %) fueron normales y de 130 parejas transferidas, 53 lograron el embarazo (40,8 %), siendo 28,5 % embarazos evolutivos y 12,3 % abortados espontáneamente. **Conclusión:** la tasa de embarazo clínico por transferencia fue 40,8 %, la tasa de aborto 12,3 % y el error diagnóstico 1,8 %. El diagnóstico preimplantatorio permite establecer embarazos no afectados con una certeza del 98 % similar al prenatal efectuado en vellosidades coriónicas, con la ventaja de minimizar al 2 % el riesgo del establecimiento de un embarazo genéticamente anormal para el riesgo en cuestión.

**Palabras clave:** diagnóstico genético preimplantatorio, PGD, screening de aneuploidías embrionarias, PGS, diagnóstico de enfermedades génicas y cromosómicas.

## Abstract

**Introduction:** there are several types of embryo biopsy. The main one is the biopsy of cleaved embryos of day 3, but this is being replaced by the blastocyst biopsy due to its advantages. **Objective:** to document the experience achieved with preimplantation genetic diagnosis in blastocyst biopsy and deferred transfer of the stimulated cycle for couples with increased genetic risk and other medical reasons. **Materials and Methods:** 269 cycles of preimplantation genetic diagnosis were performed in 161 couples, who were divided into: monogenic disorders, balanced rearrangements, aneuploidy embryo screening, histocompatibility typing and selection of the embryo with negative Rh factor in highly sensitized women. Genetic studies were approached by mini-sequencing, comparative genomic hybridization array and fluorescent quantitative polymerase chain reaction. A blastocyst without mutations was transferred to the uterus at 30/60 days of the stimulated cycle. **Results:** 334 (39%) out of the 850 blastocysts studied were normal and 130 couples were transferred, 40.8% of them achieved pregnancy, 28.5% are ongoing pregnancies and 12.3% aborted spontaneously. **Conclusion:** The clinical pregnancy rate per transfer was 40.8%, the abortion rate 12.3% and the misdiagnosis 1.8%. The preimplantation diagnosis allowed establishing unaffected pregnancies with a diagnostic certainty of 98 % similar to prenatal diagnosis in chorionic villi, with the advantage of reducing to 2 % the risk of establishing a genetically abnormal pregnancy for the risk in question.

**Key words:** preimplantation genetic diagnosis, PGD, screening of embryonic aneuploidies, PGS, diagnosis of gene and chromosomal diseases.

## Introducción

El diagnóstico genético pre-implantacional, conocido internacionalmente con la sigla PGD, es una alternativa de diagnóstico prenatal que se realiza en los pre-embriones originados *in vitro*, con la finalidad de seleccionar aquellos no afectados para una determinada condición genética y facilitar, así, el establecimiento de un embarazo libre de la afección que aqueja a la pareja. Por lo tanto, es una alternativa diagnóstico-terapéutica válida respecto de los diagnósticos prenatales convencionales que se realizan una vez establecido el embarazo.

Existen tres fuentes para la obtención del ADN pre-embionario en el que se realiza el estudio genético: a) biopsia del cuerpo polar I y II antes de la fecundación y en el momento de la fecundación, respectivamente, b) biopsia de una blastómera en ovocitos fecundados clivados con 6 a 8 células en día 3 del desarrollo *in vitro* y c) biopsia de trofoectodermo del blastocisto en día 5/6.

Para poder obtener las células se debe realizar una perforación en la zona pelúcida, ya sea por métodos mecánicos, químicos o físicos. De las tres opciones de biopsia, hoy la preferida es la biopsia del trofoectodermo que permite obtener varias células, entre 5 y 10, lo que asegura disponer de más cantidad de ADN para los estudios, además de no perturbar las células del macizo celular interno que originarán al futuro embrión-feto-nacido. Esto, por un lado, tranquiliza porque las células extraídas no están destinadas a formar parte del embrión, pero, por otro lado le quita valor diagnóstico, o sea que sólo permite inferir la constitución del embrión si se asume que todas las células conservarán la constitución fijada en el momento de la fecundación [1].

En sus comienzos el PGD se realizaba casi exclusivamente en las parejas con mayor riesgo para enfermedades monogénicas. En cambio, en la actualidad es usado mucho más en los laboratorios de fecundación *in vitro* para seleccionar a los blastocistos euploides que tienen mayor posibilidad de implantación. Cuando la finalidad es el screening de las aneuploidías pre-embionarias, para diferenciarlo del PGD se lo llama screening preimplantatorio de aneuploidías con su sigla en inglés PGS. En la actualidad, aproximadamente el 20 % de los diagnósticos son verdaderos PGDs y la mayoría son PGS con la finalidad de lograr la máxima eficacia en las diferentes técnicas de reproducción asistida. Cuando la caracterización molecular del trastorno en cuestión es conocida, el estudio genético es de tipo directo, pero cuando se desconoce y existen familiares afectados puede ser de tipo indirecto por ligamiento.

Más de 300 diferentes trastornos monogénicos han sido evaluados preimplantatoriamente alrededor del mundo [2]. Los más frecuentes son: hemoglobinopatías, fibrosis quística, atrofia muscular espinal, distrofia muscular de Duchenne, fragilidad del X y distrofia miotónica. Si bien, las indicaciones de PGD/PGS son similares a las del diagnóstico prenatal convencional (PND) en vellosidades o amniocitos, el PGD tiene menos objeciones éticas que el PND. Como la

finalidad del PGD/PGS es transferir pre-embriones no afectados, se evita la posibilidad de la interrupción del embarazo debido a un trastorno genético, que en Argentina está penado, mientras que la selección pre-embionaria, se podría decir que es lícita por la existencia de la ley de cobertura de las técnicas de fecundación *In vitro* desde el año 2012.

Otra gran ventaja es que las personas con riesgo de haber heredado una mutación con manifestación en vida adulta pueden acceder al PGD sin que se revele su condición de portador. Tal es el caso de la enfermedad de Huntington, que es una enfermedad progresiva sin cura que se manifiesta tardíamente en la vida, generalmente cuando los hijos de los afectados están planeando tener hijos. Muchos de ellos quieren asegurarse que sus descendientes no tengan la mutación sin revelarse el status de portador en ellos. A este respecto, el PGD permite la no transmisión sin revelar si desarrollará o no la enfermedad.

Los pacientes portadores de mutaciones con riesgo de tener descendencia con predisposición a desarrollar tumores a lo largo de su vida son otro ejemplo de la ventaja del PGD, ya que no se admitiría realizarlo por PND una vez logrado el embarazo.

Otra aplicación, aunque muy discutida, es la búsqueda de un hijo histoiéntico a uno existente que requiere de trasplante de médula ósea para sobrevivir y curarse con el tratamiento con las células del cordón umbilical. Las mujeres Rh negativas, altamente sensibilizadas con anticuerpos RHD también pueden evitar una probable eritroblastosis fetal con la selección de los pre-embriones Rh negativos.

Desde hace tiempo se viene sosteniendo que la transferencia de pre-embriones euploides podría restaurar la fertilidad perdida en las mujeres de edad avanzada que acceden a la fecundación *in vitro* (FIV). Si se tiene en cuenta que la tasa de embarazo disminuye a medida que aumenta la edad de la mujer y que la tasa de aborto espontáneo aumenta debido fundamentalmente a la mayor tasa de ovocitos aneuploides, es perfectamente entendible que la transferencia de pre-embriones euploides debería aumentar la tasa de embarazos evolutivos. Sin embargo, ese objetivo se ha logrado en mujeres de buen pronóstico que son las que responden bien a la estimulación ovárica y que pueden producir suficientes blastocistos para seleccionar. Al inicio, el screening de aneuploidías se efectuaba enumerando un determinado número de cromosomas con la técnica de hibridación *in situ* fluorescente en biopsias de blastómeras, la cual en la actualidad fue reemplazada por las diferentes plataformas de cariotipos moleculares que permiten diagnosticar desbalances mayores a 2MB, tales como aCGH, aSNPs o NGS [3-6]. Las expectativas actuales son mucho más promisorias que con el empleo de la técnica FISH, pero todavía no hay ensayos clínicos bien diseñados que avalen su real beneficio en las parejas con mayor riesgo cromosómico en la fecundación [7].

El propósito de este trabajo es documentar la experiencia adquirida con el programa de PGD con biopsia de trofoblas-

to y transferencia diferida al ciclo de estimulación ovárica desde fines del año 2009. Dos tercios de las motivaciones fueron riesgo genético aumentado o por razones médicas entendibles, tales como la búsqueda de un hijo histoiéntico a otro que requiere trasplante de médula ósea o los casos de mujeres Rh negativas altamente sensibilizadas, mientras; un tercio tras el logro de mejores resultados en reproducción asistida.

## Materiales y Métodos:

### Pacientes:

Accedieron al programa PGD 161 parejas por motivaciones diferentes: 64 por trastornos monogénicos, 39 por rearrreglos cromosómicos equilibrados, 6 para tipificado de HLA, 2 por isoimmunización RHD y 50 para screening de aneuploidías.

Los trastornos monogénicos [64] se separaron en 4 grupos:

**Autosómicas Recesivas:** atrofia muscular espinal AME [7], Fibrosis quística [8],  $\beta$ Talasemia [5], Inmunodeficiencia combinada severa [1], acidemia metilmalónica [1], Síndrome de Leigh [1], leucodistrofia metacromática [1], epidermolisis bullosa [1] y Síndrome de Zellweger [1]

**Autosómicas Dominantes:** Neurofibromatosis tipo 1 [3], Von Hippel Lindau [2], Síndrome de Marfan [1], Síndrome de Stickler [1], Poliquistosis renal PKD1 [2], Síndrome de Di George [1], Síndrome de Ehrlers-Danlos [1], Paraganglioma [1], Acondroplasia [2], Esclerosis Tuberosa [1] y Angioedema Hereditario [1].

**Ligados al X:** Distrofia muscular de Duchenne-Becker [4], Síndrome de Hunter [1], Hemofilia B [3], Agammaglobulinemia [2], Deficiencia de OTC [1], Síndrome de Alport [1], Granulomatosa Crónica [1] y Síndrome de Leri-Weil [1].

**Expansión de tripletes:** Fragilidad X [3], Distrofia Miotónica [4], Enfermedad de Huntington [1].

Los rearrreglos cromosómicos fueron 26 translocaciones recíprocas, 8 translocaciones Robertsonianas y 5 inversiones pericéntricas. Los rearrreglos cromosómicos en todos los casos fueron portados por un sólo miembro de la pareja, excepto uno en que un miembro portaba una translocación recíproca y el otro una Robertsoniana.

Las translocaciones recíprocas fueron las siguientes:

t(15;18)(q26;q21)mat; t(2;9)(q37;p12)pat;  
t(1;8)(q41-q42;q12)mat; t(3;10)(p25;q24)mat;  
t(6;14)(q13;q31)pat; t(9;13)(q34.3;q14.3)mat;  
t(6;7)(q25;p15)pat; t(13;17)(q22;p11)pat;  
t(10;13)(q21.3;q21.2)pat;  
t(4;9)(q21;p22)mat+rob(13;14)(q10;q10)pat;  
t(9;13)(q21;q21.2)mat; t(8;16)(q24.3;q12)pat;  
t(3;10)(p21;q24),9ph pat; t(1;3)(q42.1;p21.3)mat;  
t(7;11)(q11.2;q12)mat; t(1;11)(q12;q13)mat;  
t(10;19)(q10;q10)pat; t(3;6)(q26;q24)pat;  
t(6;7)(q23;q34)mat; t(9;11)(q32;q21)pat;  
t(6;10)(q25;q26)mat; t(4;12)(p15.2;p12.1)pat;  
t(2;22)(q35;q13)mat; t(4;18)(q32;q31)pat;  
t(3;8)(p21;p11.2)pat; t(9;13)(q21;q21.2)mat

Las translocaciones Robertsonianas fueron:  
4 rob(13;14)pat, 1 rob(13;14)mat, 1 rob(13;21)pat,  
1 rob(14;21)pat y 1 rob(14;22)mat

Las inversiones pericéntricas fueron:  
inv(8)(p23;q11.2)pat; inv(5)(p12;q22)pat;  
inv(9)(p21;q22)pat; inv(5)(p14;q21)mat; inv(5)(p12;q22)pat.

Los PGDs para tipificado de HLA fueron 6, tres de ellos asociados a Granulomatosa Crónica,  $\beta$ Talasemia y S. Hurler, respectivamente.

Dos casos de PGD fueron por isoimmunización RHD

Los casos de PGS fueron 50.

El promedio de edad de las mujeres que realizaron PGD fue 34,8 años [r 22 - 42], mientras que la de los PGS 38,8 años [r 38 - 49].

En todas ellas se efectuó previo al procedimiento la evaluación hormonal de la reserva ovárica y el recuento de folículos antrales por ecografía transvaginal para predecir la respuesta ovárica a la estimulación ovárica. Además, se les realizó histerosalpingografía para evaluar la anatomía de la cavidad y las trompas uterinas. En todas también se realizó previamente una transferencia de embriones simulada comúnmente llamada prueba de cánula para evitar inconvenientes durante la verdadera transferencia.

En los varones se evaluó el espermograma, se efectuó espermocultivo y el swim up diagnóstico.

La estimulación ovárica se realizó con gonadotrofinas con agonistas o antagonistas del GnRH de acuerdo con el perfil hormonal de las mujeres, mientras que para las mujeres con reserva ovárica muy disminuida se utilizó mini-estimulación con clomifeno y gonadotrofinas en dosis baja. La aspiración de los folículos se realizó por vía transvaginal con anestesia local y neuroleptoanalgesia, previa toilette vaginal. Los ovocitos fueron recuperados de los fluidos foliculares bajo lupa y cultivados en microgotas con medio de cultivo embrionario en incubadora trigas con 5 % de tensión de oxígeno y a las dos horas desnudados de su corona radiata, para la evaluación de la maduración y la calidad de los mismos. Solamente a los ovocitos en telofase I se les realizó el ICSI, previo procesamiento del eyaculado con la técnica del swim up. Entre las 18 y 20 hs de realizado el ICSI se verificó la fecundación de los ovocitos y sólo los fecundados normales se cultivaron hasta alcanzar el estado de blastocisto en medio de cultivo embrionario no secuencial. Para favorecer la biopsia del trofoblasto en día 4 se perforó la zona pelúcida, con unos disparos de rayos láser, para poder eclosionar algunas células del trofoblasto al quinto día, las cuales fueron aspiradas con ayuda del micromanipulador microscópico. Las células aspiradas se lavaron tres veces en medio de biopsia, sin calcio ni magnesio y se depositaron en tubos para PCR de 0,2 ml con no más de 2  $\mu$ l de medio de biopsia. Los blastocitos luego de ser biopsiados se vitrificaron individualmente en cryotops sistema abierto y las células removidas conservadas a -20 °C hasta ser analizadas.

Los trastornos genéticos se abordaron de las siguientes maneras:

**Tabla I.** Primers utilizados en los PGDs por amplificación directa de la mutación.

Gen	Mutación	Técnica	Primers 5´-3´
Cadena gama receptor IL2	ins280pb en Intron 5	Amplificación directa de la ins280pb	F: FAM-CACAACAAATAAGGTCCACT R: CAATGCAAACAGGAAAGGATTCT
HBD	Mutación Siciliana (delección)	Gap-PCR	D1 F (flank): FAM-AAGTCGTTGTAGGAGACAG D2 R int2-3 (flank): GGTAAGCAGATACATGCATA D3 R (delec.): TGCTTGGTAGATCTCTCCCA
SMN1	del exon 7 y 8	Tetraprimer: amplificación exones 7 y 8 SMN1 y SMN2	OUTER1/2F: FAM-TGCAGCCTAATAATTGTTTCTTTGGG OUTER1/2R: TTAATGTTCAAAAACATTTGTTTCCAC SMN1 IN F: FAM-ACTTCTTTATTTCTTACAGGGTGTCT SMN2 IN R: AGCACCTTCTTTTGTATTGTATA
SMN1	del exon 7 y 8	Amplificación exones 7 y 8 del gene SMN1. STR ligado al gene SMN1 como control de amplificación.	SMN1 F: FAM-AGACTATCAACTAATTTCTGTATCA SMN1 R: TCCTTCTTTGATTTGTCTG D5S610 F: HEX-TCCAGTGAATTTTCATTTTCAGATAC D5S610 R: CCAGCCTAACTGAACCTTCAAAG
TSC2	dup 23bp	Amplificación directa de la dup.23pb	EX34dupF: FAM-TGATGCCTGGCCTTCTCTGCA EX34dupR: GAGGGTCCCTTGCCTCCAGCTC
DMPK	Repeticiones CTG	Amplificación alelo normal y STR ligado al crom. 19 como control de amplificación.	DM102F: FAM-CTTCCAGGCTGCAGTTGGCCATC DM102R: GAACGGGGCTCGAAGGGCTCTGTAGC D19S559F: HEX-CACCACTGCACTCCAGCTGTGTG D19S559R: CGATTTGGGACATAATAGGTTTGAAG
DMPK	Repeticiones CTG	TP-PCR	P2: GAACGGGGCTCGAAGGGCTCTGTAGCCG P3: 6FAM-TACGCATCCAGTTTGAGACG P4CAG: TACGCATCCAGTTTGAGACGCAGCAGCAGCA
HD	Repeticiones CAG	Amplificación directa de los alelos normales y amplificados. STR ligado al gene crom. 4 como control de amplificación.	H3: VIC-CCTTCGAGTCCCTCAAGTCTTTC H5: CGGCTGAGGCAGCAGCGGCTGT D4S43F: NED-CTTCTTTTCTCTCTGGATGC D4S43R: HEX-AGAAAGCATTGAGGTTCCATC
FMR1	Repeticones CGG	Amplificación directa del alelo normal	FUC: GCTCAGCTCCGTTCCGGTTCACTTCCGGT FUF:VIC-AGCCCCGCATCCACCACCAGCTCTCCA
FMR1	Repeticones CGG	TP-PCR	FF1: FAM-TTCGGTTTCACTTCCGGTGGAGGGCCCGCT F30K: ATGGCTATGCGTAGGGTCAAACAGT F2: ATGGCTATGCGTAGGGTCAAACAGTCCGCCGCCGCCG

► F=Forward; R=Reverse

a) para deficiencias y/o duplicaciones por qf-PCR utilizando primers específicos de las zonas implicadas (Tabla I)

b) los trastornos monogénicos puntuales fueron analizados por minisequenciación directa de las mutaciones caracterizadas. Esencialmente, la técnica consistió en amplificar el segmento donde se encuentra la mutación y sobre ese amplicón con primers específicos diseñados se minisequenciaron las mutaciones utilizando el SNaPshot® multiplex Kit de Applied Biosystems y los fragmentos analizados en un ABIPrism310 Genetic Analyzer (Tabla II). Previo al procedimiento, las mutaciones fueron corroboradas en los progenitores y/o familiares portadores/afectados.

En los casos sin la caracterización molecular de la mutación se realizó análisis por ligamiento con STRs ligados al gen mutado (Tabla III).

Además de abordar las mutaciones, siempre se realizó el screening del par 21 usando los STRs informativos de cada una de las parejas (Tabla IV).

En el tipificado de HLA se determinó el haplotipo informativo a partir de STRs ligados al locus, que mapea en 6p (Tabla V).

Los dos casos de isoinmunización RHD fueron realizados

con tres primers que amplifican simultáneamente los Rh C, E y D (Tabla VI).

Previo a acceder al procedimiento se acondicionó la técnica para la determinación en pocas células, que en general fue entre 4 y 10 células, similar al número de células obtenidas en la biopsia embrionaria. El lisado de las células se realizó con la mezcla constituida por 2,5 µl de agua libre de nucleasas, 0,5 µl buffer thermophilic DNA poly 10X de Promega®, 0,5 µl proteinasa K de concentración 10 µg/µl y 0,5 µl de Tween20® de Promega al 1 %, en un volumen final de 5 µl. Los tubos fueron incubados a 45 °C / 20 min. y luego 96 °C / 20 min. Se colocan los tubos en hielo y se le agrega 45 µl de la siguiente mezcla: 10 µl del buffer 5XGoTaq de Promega®, 1µl de DNTPs 10mM, 1 - 1,5µl de la mezcla de primers 25 µM, 0,3 ul de GoTaq polimerasa de Promega®, todo en un volumen final de 50 ul. En el termociclador, las condiciones de ciclado de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C / 5 min, seguida de 35 ciclos de: 95 °C / 30seg, el annealing varió entre 50- 63 °C / 30 - 45 seg, extensión a 72 °C / 30 - 45 seg, con una extensión final a 72 °C / 5 - 7 min.

Los resultados de las QF-PCRs fueron directamente ana-

lizados en un secuenciador ABIprism310 con el software GeneMapper.

Para la técnica de minisequenciación, a 1  $\mu$ l del amplicón obtenido en la primera reacción se le realizó una segunda PCR adaptando las concentraciones de los reactivos de la mezcla descrita previamente a un volumen final de 15  $\mu$ l. Los primers utilizados en esta segunda reacción corresponden únicamente al segmento genómico que posee la mutación. Las condiciones del termociclado son iguales a las últimas descritas, excepto que fueron 25 ciclos. La banda amplificada fue observada por electroforesis en un gel de agarosa 3 % con bromuro de etidio bajo luz UV. La misma fue cortada y purificada con el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega®. La solución de ADN fue mini-secuenciada con el kit SNaPshot Multiplex de Promega® utilizando el primer forward o el reverse correspondiente a la mutación. Las condiciones de la PCR fueron 25 ciclos a 96 °C / 10 seg, 50 - 55 °C / 5 seg y 60 °C / 30 seg. Finalmente se adicionó a la reacción 1  $\mu$ l de la enzima T-SAP de Promega® y se incubó a 37 °C / 1 min y 75 °C / 15 min. Los resultados se analizaron por electroforesis capilar en un ABI prism 310.

Para la QF-PCR que amplifica las repeticiones CGG del gen FMR1, el dGTP de los DNTPs de la mezcla de reacción se reemplazó por 7'-deaza-dGTP y se adicionó a la misma 5  $\mu$ l de PCR MAX de Promega®.

Los cariotipos moleculares fueron realizados con el kit 24 Sure V3 y 24 Sure plus de BlueGnome-Illumina® para los PGSs y reordenamientos equilibrados, respectivamente. La técnica consistió en una amplificación inicial de todo el material genético de las células biopsiadas utilizando el kit Sureplex de Illumina®, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La amplificación fue corroborada por electroforesis en gel de agarosa 3 % con bromuro de etidio, se sembró 5  $\mu$ l de cada amplicón mezclado con 1  $\mu$ l de solución de azul de bromofenol. Se verificó a los cinco minutos de corrida electroforética, bajo UV, la presencia de una banda mayor a 500 pb y luego se continuó con la hibridación con los kits 24 Sure V3 y 24 Sure Plus de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los arrays fueron analizados con el programa BlueFuse® Multi v.4.1.

La transferencia de un sólo blastocisto no afectado desvitrificado fue realizada en el ciclo siguiente al estimulado, con el endometrio preparado fisiológicamente con estrógenos y se abrió la ventana de recepción con el agregado de 5 días de progesterona, independiente del día en que alcanzó el estadio de blastocisto. La fase lútea fue suplementada con la misma medicación hasta la determinación de la subunidad beta de HCG y en caso de dar positiva hasta las 16 semanas del embarazo. A las 4 semanas de la realización del test del embarazo se realizó ecografía obstétrica para corroborar la ubicación del saco y el latido cardíaco.

Todas las parejas fueron informadas sobre la posibilidad de realizar la amniocentesis para corroborar los resultados del PGD.

## Resultados

De un total de 161 parejas que realizaron 218 ciclos se obtuvieron 850 blastocistos, de los cuales 334 [39,3 %] fueron normales. De 130 parejas que lograron ser transferidas con un blastocisto normal, 53 consiguieron el embarazo [40,8 %] perdiéndose espontáneamente un 12,3 %.

Los principales detalles de cada una de las motivaciones figuran en la tabla VII. Como puede observarse en dicha tabla, las 26 parejas con riesgo para tener hijos con enfermedades recesivas produjeron 175 blastocistos, de los cuales 98 resultaron normales para transferir, pero 2 de las 26 parejas no lograron ninguno normal para transferir.

Las 21 parejas con riesgo para descendencia con enfermedades dominantes produjeron 141 blastocistos, de los cuales 48 resultaron no afectados, pero 3 de las 21 parejas no lograron ninguno para transferir.

Las 17 parejas con riesgo para tener 50 % de los hijos varones afectados produjeron 75 blastocistos, de los cuales 36 resultaron transferibles y todas las parejas lograron ser transferidas.

Las 6 parejas en busca de otro hijo histoiéntico a un hermano produjeron 80 blastocistos, de los cuales 11 resultaron transferibles en cuatro de las parejas, o sea que dos no pudieron transferirse.

Las 2 parejas en busca de un hijo Rh negativo lograron 4 blastocistos pero ninguno de ellos resultó transferible.

Las 39 parejas con riesgo para tener hijos con deficiencias-duplicaciones parciales de cromosomas por ser portadoras de rearrreglos cromosómicos balanceados produjeron 189 blastocistos de los cuales 69 tuvieron un cariotipo normal, pero 7 de las 39 parejas no lograron ninguno normal para transferir.

Las 50 parejas con mayor riesgo para embarazos aneuploides, pero portadores cariotipos normales, lograron 186 blastocistos de los cuales 72 tuvieron cariotipos normales, pero 15 de las 50 no lograron cariotipos normales.

Resumiendo 161 parejas realizaron un promedio de 1,6 ciclos [269 / 161]. De los 850 blastocistos logrados en 835 [97,6 %] se logró obtener un resultado y en 334 [40 %] fue normal.

## Discusión

La mayor experiencia del PGD se tiene con la realización de la biopsia de una o a lo sumo dos blastómeras en pre-embriones clivados de día 3 del desarrollo. En ese día los pre-embriones de buena calidad tienen más de 6 células, siendo los mejores los que tienen 8 células y menos de 15 % de fragmentos. La remoción de una o dos células en ese estadio, si bien todas las células son totipotenciales, significa una reducción de la masa celular entre el 12,5 y 25 %, la cual puede disminuir la posibilidad de implantación. En cambio, la mayoría de los blastocistos que están eclosionando poseen más de cien células, la remoción de 5 a 10 células del trofoectodermo significa una disminución menor de células del trofoectodermo, aparentemente sin modificación del nú-

**Tabla II.** Primers utilizados en los PGDs abordados por Minisequenciación.

Trastorno	Gen	Mutación	Primers 5´-3´
Hemofilia B	F9	Arg180Leu	F: GCCAATGAGAATATCAGG R: CCAGTTTTGACACACCATC SF: CACCAATCATTTAATGACTTCACTC SR: GTTTGGCATCTCTCCACCAACAAC
Hemofilia B	F8	c.6301 C/G	F: TTTGAGGAGGTAGCACATACATTT R: CAGGCATTCCTTTAAATGAC SF: GATCTGTTGGCACAATGATTATT SR: GCACCTGGGTCTTGATGCCGT
Hemofilia B	F8	c.1754T/C	F: TGCCATCGTTTCATCATAG R: CATTATTATCTGGACATCAC SF: CTTTCAATATATGAATTAACAGA
Agammaglobulinemia Tirosina Kinasa lig. al X	BTK	W588R	F: CTGATTCTAATCTTTGAGGTTGAT R: CAGCTATCAGTCTTTGGTGGCTG SF: TTCACCTTCTAGGGGTTTTGATG SR: CTCCCCAGGGAGTAAATTTCCC
Agammaglobulinemia Tirosina Kinasa lig. al X	BTK	R255X	F: ATCTTGAAAAAGCCACTACCG R: GTCTCTGATGAGGATGCTGATCAGG SF: AGCAACTTACCATGGTGGAGAGCA SR: GACTCACCAATTTTATCTC
DMD	DYS	c.2317 A/T	F: GATGGCAAAAGTGTGAGAAAAAGTC R: TTCTACCACATCCCATTCTTCCA SF: CATAGAGCGAGAAAAAGCTGAG SR: CTGGCATCTGCGATTTTCTGAAC
DMD	DYS	c.6936delA	F: GCTGCTAAAAAACAACAATCAG R: CAAATGAGAAATTCAGTGATATTGC SF: GTTCCAGAGCTTACCTGAGAA
Hunter	IDS	c.1403 G>A	F: TGTAACCCATTCTGCTCTGT R: CTGGAAGGGGACATCACA SF: GATTGCATATAGCCAGTATCCCC SR: CACTGAGGGATGCTGAAGGC
OTC	OTC	c.482 A>G	F: ATCTTTTTCTTGGTTTGCCACAG R: TGTTTCACTTAAAGCAAGTCAGG SF: AGAAGCATCCATCCCAATTAATCA SR: GATGGTACAAATCTGACAGCCCA
β-Talasemia	HBB	IVS110/ COD39	F/SF110: AGGCACTGACTCTCTGCTTATT R: AAAAAAACCACAAAGGACTCAAAAGAACCTCT SR39: AAAAAAACCACAAAGGACTCAAAAGAACCTCT
β-Talasemia	HBB	IVS1-2/IVS110	F: CATCTATTGCTTACATTTGCTCTG R: TGTAACCTGTTACTTATCCCTTCC SF 1-2: GGTGGTGAGGCCCTGGGCGAGG SR 1-2: CTGCTTGTAACTTGATACCA SF110: AGGCACTGACTCTCTGCTTATT
β-Talasemia	HBB	COD39	F: ACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGA R: TGTAACCTGTTACTTATCCCTTCC SF: CTGGTGGTCTACCTTTGGACC SR: AAAAAAACCACAAAGGACTCAAAAGAACCTCT
FQ	CFTR	dF508	F: GACTTCACTTCTAATGGTATTATG R/SR: ATCTATATTCATATAGGAAACAC
FQ	CFTR	G542X	F: GATTACATTAGAAGGAAGATGTCCTTT R: ACATGAATGACATTTACAGCAATGCTT SF: GCAGAGAAGACAATATAGTCTT SR: ACTCAGTGTGATTCCACCTTCTC
FQ	CFTR	c.2183AA-G	F: TTACACCGTTTCTCATTAGAAGGA R: TCTCCTGCTCAGAATCTGGTACT SF: CTGTCTCTGGACAGAAACAAAA
FQ	CFTR	c.3873+1	F/SF: GAAAGCCTTGGAGTGATACACAG R: AAGCTATGAACATTTCAATAACCAG SR: TTTTCTGGCTAAGTCTTTTGTCTCA
Zellweger Spectrum	PEX3	c.898C/T	F: GTAACCCGTTATTACTGAATTTG R: GTCATCTTACCTATTATAGAGT SF: GACAATATGGCTGAGTCTTT SR: GTTGACGGTCTGTTTCAGTAGGTC
Zellweger Spectrum	PEX3	c.991G/A	F: GTCATGATGCAATTAGAGTTG R/SR: CACTGCAACTGAATGGATCTGTC SF: CTAAGATAATCCAATAGTAAAC
Leucodistrofia Metacromatica	ARSA	c.465+1 G/A	F: CATCGATTTCTAGGCATCCCGTAC R: TCACAGCCACCGTCGCAAGGAGT SF: CCGTACTCCACGACCAG SR: CTGAGGGCCCGGTTGTTCTCA

Acidemia Metilmalonica	MMACH	c.271dupA	F: AAAAGTGTGAGGCCCTGAAGTT R: AACCTGGGTGTGTGAGAAGG SF: GGCTACCATCTGGCCGTGTTA SR: CTGAGCCTTCTCACCTCTCT
Epidermolisis Bullosa	ITGB4	p.C61Y	F: TCGGGAATAGCTGGTGGAAA R: CCCATAAATAGCCAGGCTGA SF: ATGTTCAAGGACCGGCGCT SR: AGCAGCTCCGCTGGGTGTTG
Neurofibromatosis Tipo I	NF1	c.205-1 G>C	F: TTTCACCTTTTCAGATGTGTGTTG R: CTCAGATCAAAATCCAAAAG SF: GTTCTGAATATCTTTCTGTTA SR: CAGCAGCTTCTCCAAATATCT
Neurofibromatosis Tipo I	NF1	c.7464_7467del	F: AGCCACTTGAAGGAGCAAACGAT R: AAGCACTTCTAGTGTGGCCTGAG SF: TGAAGGATACCTTGAGCCACCTATCC SR: TGGCTCGGGGACTGGTCTGGCCGA
Von Hippel–Lindau	VHL	c.219_232del	F: TACGGCCCTGAAGAAGACG R: TACCTCGGTAGCTGTGGATG SF: GTGAACCTGCGCGACCTCCCA
Von Hippel–Lindau	VHL	V84L	F: TACGGCCCTGAAGAAGACG R: TACCTCGGTAGCTGTGGATG SF: TTCTGCAATCGCAGTCCGCGCTC SR: AAGTTGAGCCATACGGGACGCA
Stickler	COL2A1	c.2301+1 G>A	F: TCTTCAGGGAATGCCTGG R: TTGCTGTGGTCTCAGGGTG SF: TGGGCCCAAGGCGACAGG SR: AGGCTGTAACCTCAGTACTTA
Ehlers-Danlos	COL3A1	c.2284-2 A/G	F: AGAAGCCATGCACTGTCTTGACATC R: GTATCTATGTCTATATCTTCTG SF: TTAATAAATATTTTATTTCTCTCT SR: ACCAATAGGACAGTAGGACCC
Poliquistosis Renal	PKD1	c.9698delA	F: GTGTCCTCAACTTCTTAATG R: CTTGAAGTTTCATGATTCCTG SF: CAGCCAACCTGACATCAACAG SR: CTTGATTGGAGGAGCTCTA
Acondroplasia	FGFR3	G1138A	F: CCTCAACGCCATGCTTTT R: AGGCAGCTCAGAACCTGGTA SF: GTATGCAGGCATCTCAGCTAC SR: ATGAACAGGAAGAAGCCACCC
Paraganglioma	SDHB	Pro56FrX61	F: CCAGCAAAATGGAATTATCTTGT R: CTCTCTTCAATAGCTGGCTT SF: ACCCAGACAAGGCTGGAGACAAA SR: GTCAACTTATAAGTCTGCATA
Angioedema Hereditario	SERPING 1	c.597 C/G	F: TCATCTGCAAGTATCTTTCATC R: CTGATACTGTAGCTCCAACATTC SF: CTGGAGAGCATCTCTCTTA SR: GACACAGGTGAAGTCTTGGG

mero de las células primordiales embrionarias.

La mayor experiencia recogida en los 20 años de aplicación del diagnóstico preimplantatorio fue con biopsia en día 3, la que evidenció una tasa promedio de embarazo por ciclo del 22,7 %, con una certeza diagnóstica mayor del 90%, según los registros del Consorcio de PGD de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología ESHRE [8]. Un inconveniente no menor cuando se trabaja con una o dos células es que no se pueda obtener el resultado del estudio genético, a pesar de haber acondicionado la técnica, que de hecho ocurre en un 10 al 20 % de las células estudiadas. En cambio, con la biopsia de trofoectodermo como la cantidad de células removidas es mayor, entre 5 y 10 células, uno se asegura prácticamente siempre el resultado de las células extraídas [9].

Los adelantos en los medios de cultivo embrionario, en las incubadoras trigas, que permiten reducir la concentración de oxígeno durante el desarrollo in vitro, el cambio de la criopreservación lenta por la vitrificación y la mayor tasa de embarazo logrado con blastocistos desvitrificados son los responsables de que los estudios preimplantatorios hoy se realicen en el estadio de blastocisto. En la presente serie constituida por 269 ciclos

correspondientes a 161 parejas la tasa de embarazo clínico por transferencia fue 40,7 %, por pareja 32,9 % y por ciclo iniciado 20 %, siendo la tasa de aborto espontáneo 8,4 % y el error diagnóstico de 1,8 %. Las fallas en la amplificación del ADN ocurrieron en 15 de 850 blastocistos analizados, o sea que no superó el 2 %, mientras que lo reportado con la biopsia de blastómeras es de 15 a 20 %.

El porcentaje de blastocistos transferibles obtenido de 39 %, si bien es algo menor, no se aleja tanto de lo esperado si se tiene en cuenta la heterogeneidad de las motivaciones y que en 72 de las 161 parejas no sólo se evaluó la mutación génica en cuestión, sino que además se determinó el número de copias del cromosoma 21 y no se consideraron transferibles aquellos que evidenciaron trisomía 21.

De las 161 parejas que accedieron al programa, 130 fueron transferidas [81 %], o sea que 31 no lograron ser transferidas ni siquiera una vez por no haber originado blastocistos normales. Los porcentajes de parejas sin transferencia dependieron fundamentalmente de la motivación del PGD: 7,7 % para las enfermedades autosómicas recesivas, 14,3 % para las autosómicas dominantes, 0% para las ligadas al

**Tabla III.** STRs utilizados en los PGDs para trastornos abordados por ligamiento.

Trastorno	Gen	STRs /Primers 5´-3´
Alport	COL4A5	<b>DXS8377</b> F: 6FAM-CAC TTCATGGCTTACCACAG R: GACCTTTGGAAAGCTAGTGT <b>DXS1068</b> F: VIC-ATTATGACTAAGGTTCTAGGGAC R: CTGAGAACACGCTGTTTTTAC <b>DXS15</b> F: 6FAM-AGCACATGGTATAATGAACCTCCACG R: CAGTGTGAGTAGCATGTAGCATTG <b>DYS393</b> F: HEX-TGGTCTTCTACTTGTGTCAATAC R: GAACTCAAGTCCAAAAATGAGG
Granulomatosa	CYBB	<b>DXS8069</b> F: PET-AACAGTCATTGTAGGCATCG R: GAATTGCCAGTCATCCC <b>DXS8091</b> F: VIC-CACATTCAGGTTCCACAGG R: CAAGATCCAGGCAAAAGTC <b>DXS1684</b> F: HEX-AGCACCCAGTAAGAGACTGAAC R: CCTCAGTGGCAACCCTCAAG
Leri-Weill	SHOX	<b>DXS1055</b> F: CTCTATGGGATACACTGTTCTGGG R: NED-GGAATGCATCCCCATCATTAA <b>DXYS10093</b> F: GCCCGTGATCCCAGTACTG R: HEX CAACTTCTTGGAAATCTTC <b>DXYS10137</b> F: CCCAGGCCCTGTTTACGCTTCG R: HEX TATCCTCACAACTGCGTCTTCC
DMD	DYS del exones 45-55	<b>Exon 44</b> F: 6FAM-TCCAACATTGGAAATCACCATTCAA R: TCATCACAAATAGATGTTCCACAG <b>Exon 49</b> F: CGTTTACCAGCTCAAAATCTCAAC R: HEX-ATATGATACGATTCGTTTGGC
DMD	DYS del exones 48-55	<b>Exon 45</b> F: HEX-AGGCTATAATCTTTAACTTTGGC R: CTCTTCCCTTTTATTCATGTTAC <b>Exon 50</b> F: HEX-AAGGTTCTCCAGTAACAGATTGG R: TATGCTACATAGTATGCTCCTCAGAC
FQ	CFTR	<b>IVS 17bCA</b> F: FAM-TGTACCTCTTCATACTCAT R: AAACCTACCGACAAGAGGA
FQ	CFTR	<b>IVS 17bTA</b> F: GCTGCATTCTATAGGTTATC R: RDX-ACAATCTGTGTGCATCG
Neurofibromatosis Tipo I	NF1	<b>NF1</b> F: VIC-CTTCCATGGCTGCTAACATC R: CCCTGGGTGAGTTCACA <b>NF3</b> F: FAM-CAGAGCAAGACCCTGTCT R: CTCCTAACATTTAATACCTTA <b>Alu</b> F: NED-CAAGAAAAGCTAATATCGGC R: GGAACCTTAAGTTCACCTAG
S. DiGeorge	Del22q.11	<b>D22S264</b> F: HEX-ATTAACCTATAAAGGAGCCC R: CACCCACCAGAGGATTCC <b>D22S944</b> F: FAM-CATGTGAAAGATGCTAATTCC R: ATCCCATGCTCCTCCCAT <b>D22S941</b> F: TAMN-AGGTTACAAAAGTACATTAACCT R: CAAGAAATGTTGGAGCTGTT
Poliquistosis Renal	PKD1	<b>D16S3252</b> F: VIC-CTCCCAGGGTGGAGGAAGGTG R: GCAGGCACAGCCAGCTCCGAG <b>D16S291</b> F: 6FAM-AGTGCTGGGATTACAGGCATGAACC R: GCAGCCTCAGTGTGTTTCTAATC <b>SM6</b> F: HEX-AGCTGGGGTCTCAGGGGAGCT R: GCGCACACAGCACTAACCG

X-Frágil	FMR1	<b>DXS8091</b> F: HEX-CACATTGAGTCCACAGG R: CAAGATCCAGGCAAAAGTC <b>DXS8377</b> F: FAM-CACTTCATGGCTTACCACAG R: GACCTTTGAAAAGCTAGTGT <b>DYS393</b> F: HEX-TGGTCTTCTACTTGTGCAATAC R: GAACTCAAGTCCAAAAATGAGG
----------	------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

► FQ= Fibrosis Quística; DMD= Distrofia Muscular de Duchenne; S.= Síndrome; del= delección; F= Forward; R= Reverse.

X, 33,3 % para el tipificado del HLA, 100 % por la isoimmunización RHD, 18 % en los reordenamientos cromosómicos balanceados y 30 % para los PGSs. Si se tiene en cuenta que la posibilidad de obtener blastocistos transferibles es dependiente de la motivación del PGD, es entendible que los porcentajes más altos correspondan a las motivaciones por tipificado de HLA, Reordenamientos Cromosómicos Balanceados y PGS, en los cuales la posibilidad teórica de obtener blastocistos transferibles es 1 de cada 4, 1 de cada 5 y de 1 de cada 8; respectivamente. En humanos, el porcentaje de ovocitos fecundados normales que alcanza el estadio de blastocisto, rara vez supera el 50 % debido a la mala programación de los ovocitos para ser embriogénicos y a la compatibilidad de los genomas de ambos progenitores. Un ovocito bien programado es el que logra hacer suficiente acopio de nutrientes que permite que el ovocito fecundado se divida hasta alcanzar más de 6 células en día 3 del desarrollo, pero en el humano la eficiencia nunca es 100 % sino alrededor del 60 %. Una vez alcanzado el estadio de 6 - 8 células, el 80 % de los mismos continúa el desarrollo. Por lo tanto, para predecir la posibilidad de lograr embriones para transferir, no sólo hay que tener en cuenta el riesgo genético sino también la embriogenicidad de los ovocitos fecundados. Se debe recordar que el procedimiento es diagnóstico-terapéutico y se convertirá en terapéutico siempre que se puedan transferir blastocistos no afectados. Las parejas jóvenes y fértiles son las que tienen más posibilidades de conseguir el

beneficio del PGD, mientras que las de edad avanzada que son subfértiles tienen menos posibilidades. Esto se puede ver claramente en las parejas que hicieron PGS, fundamentalmente por edad materna avanzada, si bien la tasa de embarazo por transferencia fue de 40 %, hubo 15 de las 50 parejas que no pudieron ser transferidas por resultar todos los blastocistos aneuploides.

### Discusión:

La biopsia de trofoectodermo es considerada menos invasiva que la de blastómeras, ya que la proporción de células removidas es mucho menor e involucra a la porción no embrionaria del blastocisto, con prácticamente poco riesgo de degeneración después de la biopsia y sin impacto indeseable sobre el potencial implantatorio.

Cuando se la quiere usar como PGS tiene el inconveniente de descartar blastocistos aneuploides que podrían desde lo teórico auto corregirse o bien confinarse la anomalía en la placenta. Todavía no existen ensayos clínicos bien diseñados que permitan evaluar la tasa real de falsos positivos y negativos. La transferencia de blastocistos aneuploides, de acuerdo con las comunicaciones de varios autores, puede dar lugar a nacidos

**Tabla IV.** STRs ligados al cromosoma 21 utilizados en los PGDs.

STR	Primer 5'-3'
D21S268	F: GCAACAGAGTGAGACAGGCTC
	R: NED-AGTTTGTTCACATCCTTGCC
D21S1442	F: 6FAM-CTCCTCCCCACTGCAGAC
	R: TCTCCAGAATCACATGAGCC
D21S1446	F: HEX-ATGTACGATACGTAATACTTGACAA
	R: GTCCCAAAGGACCTGCTC
D21S11	F: 6FAM-TATGTGAGTCAATCCCCAAGTGA
	R: GTTGATTAGTCAATGTTCTCCAG
D21S1411	F: TAMN-TGGATAGATAGATAAATGGATGG
	R: CCCACTCCCAGCCTTCTAA
D21S1270	F: HEX-CTATCCCAGTATTATTACAGGGCTGA
	R: GTCTCCAGGTTGCAGGTGACA

► F=Forward; R=Reverse

**Tabla V.** Primers ligados al locus HLA utilizados en los PGDs.

STRs	Primers 5'-3'
D6S510	F: FAM AATGGGCTACTACTTCACACC
	R: CAACACTGATTCCATAGC
MICA	F: FAM AAAGTGCTGGTCTCAGAGTC
	R: CTTACCATCTCCAGAACTGCC
DQCAR	F: GCATCATCATAAATTTGCTTCCACAGTAC
	R: HEX TGATTATAAGGCAAGAATCCAGCATATTGG
D6S1568	F: HEX AGATATCCCCCAAGGCGAG
	R: AGCTAGGCCAGGCGGTGT
D6S2414	F: PET AACTGGGCTGAGATGTACCACT
	R: GACTCAAGGAGAGGAATGTGTG
D6S497	F: PET CCTGGGCAACAAGAGTGA
	R: TTGGCTGTTGAATGTGAGAGT
RF	F: HEX CTGTCCTATTTTCATATGCTCAGGTA
	R: TTGCTCTGAGAATGAAGGTCTAGA
MOG-TAAA	F: FAM TGGGCACCTATAATACCAGCTAC
	R: AAGGGGTTAGAAGTGTGCTTATGAA

► F = Forward; R = Reverse

**Tabla VI.** Primers de isoimmunización RhD.

Marcador	Primer 5'-3'
Rh38446d6c	F: 6FAM-TCTGGGTGGTTATGTGGG R: GCAGTCAGCAGGTTGGGTT
Rh41712d4c	F: VIC-CCCTATGATGAGACTGGTGGC R: CATGCTGCTGGCATCTGTTG
Rh48925d3c	F: VIC-CAGGCGCCAGAGATCATTACT R: TCGTATTCCCTTCGTGGTG

► F=Forward; R=Reverse

normales, estimado en un 5% [10,11,12]. A raíz de estos datos la Sociedad Internacional de Diagnóstico Preimplantatorio, PGDIS, advirtió que no siempre un resultado anormal es sinónimo de no transferencia, la cual depende fundamentalmente del cromosoma involucrado y del número de copias. En principio todas las monosomías, excepto la del X, pueden transferirse, ya que todas de ser verdaderas son letales en el período preimplantatorio y no darían lugar ni a abortos clínicos. En cambio, con las trisomías se podrían transferir aquellas que nunca llegan a término y/o la aneuploidía de cromosomas con impronta debido a que un rescate incorrecto de la trisomía, en el afán de corregirla, podría originar una disomía uniparental grave (cr14 y cr15), como también las trisomías de los cromosomas 2, 7 y 16, que, a pesar de confinarse a la placenta, producen severo retardo de crecimiento intraútero [13]. Obviamente las trisomías 21, 13 y 18 son las menos aconsejables de transferir, porque son las que más llegan a término y nacen [14]. La mencionada postura de la PGDIS toma relevancia en los casos en que sólo se ha

logrado un único blastocisto de buen aspecto pero aneuploide, como suele suceder en las mujeres de 40 ó más años y que la no transferencia podría quitarle la posibilidad de tener a su hijo genético.

La gran ventaja de la biopsia de trofoblasto es la obtención de una mayor cantidad de células para efectuar el estudio genético, lo cual permite tener siempre un resultado, favorable o no, además de permitir la realización de cualquiera de los métodos diagnósticos genéticos disponibles.

Otra gran ventaja, es que los estudios se realizan solamente en los pre-embriónes que han alcanzado el grado máximo de desarrollo en el laboratorio, o sea potencialmente transferibles. Este hecho, sobre todo en Argentina, toma relevancia porque sólo se estudian a los blastocistos potencialmente implantables, reduciéndose así substancialmente los costos de los estudios moleculares. Si bien la biopsia de trofoblasto obliga vitrificar a los blastocistos una vez realizada la biopsia, en la actualidad no existen dudas de que la transferencia de un blastocisto desvitrificado en un ciclo sin estimular tiene más posibilidades de implantar que en el ciclo estimulado [15,16]. Además, una reciente revisión sistemática y meta-análisis de 11 estudios mostraron mejores resultados obstétricos y perinatales con los embriónes criopreservados *versus* no-criopreservados [17,18]. Los mejores resultados probablemente se deban a una mejor sincronización embrión-endometrio [19]. Un endometrio más fisiológico tiene mayor posibilidad de implantar debido a que no está expuesto a las altas dosis farmacológicas de hormonas producidas en el ciclo estimulado. La menor invasividad de la biopsia, el mayor número de células aspiradas, la programación de los estudios en días laborables y los resultados logrados en cuanto a tasa de embarazo y evolución de los mismos son los

**Tabla VII.** Detalles de los resultados según la motivación del PGD.

Motivo	Parejas (n)	Nº Ciclos totales	Nº ciclos/parejas		Total blastocistos analizados	Resultados (%)			PBN/p [rango]	E/transf. (%)	AE/transf. (%)
			1	≥2		N	A	F			
AR	26	45	17	9	175	98	76	1	3,8 [0-7]	8/24 [33,3]	5/24 [20,8]
AD	21	39	12	9	141	48	91	2	2,3 [0-5]	7/18 [38,9]	1/18 [5,5]
Lig X	17	23	16	1	75	36	38	1	2,1 [0-4]	6/17 [35,3]	1/17 [5,8]
HLA	6	20	2	4	80	11	67	2	1,8 [0-2]	4/4 [100]	3/4 [75]
RHD	2	2	2	-	4	0	4	0	0	-	-
RCB	39	64	23	16	189	69	116	4	1,8 [0-5]	14/32 [43,8]	4/32 [12,5]
PGS	50	76	30	20	186	72	109	5	1,4 [0-4]	14/35 [40]	2/35 [5,7]
total	161	269	102	59	850	334 [39]	501 [59]	15 [2]	1,8	53/130 [40,8]	16/130 [12,3]

► N = Normal, A= Anormal, F = falla en la amplificación, PBN/p = promedio de blastocistos normales por pareja, E/transf. = tasa de embarazo por pareja transferida, AE/transf. = tasa de aborto espontáneo por pareja transferida.

responsables de su elección cuando se requiere hacer un PGD. Con un programa de biopsia de blastocisto y transferencia en un ciclo posterior al estimulado ya no es necesaria la premura en obtener los resultados. Esta posibilidad también permite que las mujeres mayores puedan hacer acopio de blastocistos en varios ciclos de estimulación. La transferencia de un blastocisto cromosómicamente normal le otorgará una buena chance de embarazo con mínima posibilidad de aborto espontáneo [20,21]. Sin embargo, hay que tener presente que todas las biopsias que se pueden realizar en la etapa preimplantacional *in vitro* son invasivas y tienen el valor de *screening*. Por más que se tomen todos los recaudos en el control del laboratorio, siempre las condiciones de los ovocitos fecundados son subóptimas respecto de las del hábitat natural, sobre todo en los momentos en que hay que practicar la perforación de la zona y la toma de la biopsia, las cuales pueden favorecer anomalías en las divisiones celulares. De hecho, la tasa de mosaicismo en los pre-embriones está muy incrementada respecto de la hallada en vellosidades coriales, amniocitos y recién nacidos. La única metodología con valor diagnóstico es la amniocentesis que permite el estudio de las células exfoliadas del feto. Por lo tanto, es mandatorio informar a las parejas que la certeza diagnóstica del PGD es muy buena, pero no 100 % y al respecto aconsejarles acerca de la vigilancia durante el embarazo y que, si desean corroborar el resultado del PGD una vez establecido el mismo, el método ideal es la amniocentesis, ya que la punción de vellosidades daría el mismo resultado que la biopsia de trofoblasto.

### Referencias bibliográficas

- Coco R. Repro genetics: Preimplantational genetics diagnosis. *Genet Mol Biol*. 2014; 37(1 Suppl):271-84.
- De Rycke M, Belda F, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB, Traeger-Synodinos J, et al. ESHRE PGD Consortium data collection XIII: cycles from January to December 2010 with pregnancy follow-up to October 2011. *Hum Reprod*. 2015; 30(8):1763-89.
- Handyside AH. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies. *Fertil Steril* 2013; 100:595-602.
- Treff NR, Tao X, Schillings WJ, Bergh PA, Scott RT Jr, Levy B. Use of single nucleotide polymorphism microarrays to distinguish between balanced and normal chromosomes in embryos from a translocation carrier. *Fertil Steril* 2011; 96: e58-e65.
- Fedorova EM, Shlykova SA, Shunkina KV, Zaitceva OG, Lapina EN, Yanchuk TV et al. Outcomes of IVF cycles coupled with PGS by aCGH of embryos from donor and autologous oocytes, transferred after vitrification to women of advanced maternal age. *Gynecol Endocrinol*. 2017;33(9):737-740.
- Fiorentino F, Bono S, Biricik A, Nuccitelli A, Cotroneo E, Cottone G, et al. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum Reprod*. 2014; 29(12):2802-13.
- Orvieto R. Preimplantation genetic screening- the required RCT that has not yet been carried out. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016; 14:35.
- Harper JC, Wilton LJ, Traeger-Synodinos J, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB, et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Hum Reprod Update*. 2012;18(3):234-247.
- Coco R, Mondadori A, Ducatelli ME, Mincman J, Gallo A, Coco F et al. Preimplantation diagnosis in blastocyst biopsy and deferred cycle transfer. *JBRA Assist Reprod*. 2012;16(5):268-270.
- Gleisher N, Vidali A, Braverman J, Kushnir VA, Albertini DF, Barad DH. Further evidence against use of PGS in poor prognosis patients: report of normal births after transfer of embryos reported as aneuploidy. *Fert Steril* 2015; 104(3), Supplement, page e59.
- Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy Babies after Intrauterine Transfer of Mosaic Aneuploid Blastocysts. *N Engl J Med*. 2015; 19; 373(21):2089-90.
- Scott KL1, Hong KH, Scott RT Jr. Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing. *Fertil Steril*. 2013; 100(3):608-14.
- Lestou VS, Kalousek DK. Confined placental mosaicism and intrauterine fetal growth. *Arch Dis Child fetal Neonatal Ed* 1998; 79: F223-F226.
- PGDIS. Position statement on chromosome mosaicism and preimplantation aneuploidy testing at the blastocyst stage. *PGDIS Newsletter*. 2016; July 19.
- Shapiro B, Daneshmand S, De Leon L, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Frozen-thawed embryo transfer is associated with a significantly reduced incidence of ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 2012; 98(6):1490-1494.
- Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013; 99(1):156-152.
- Davies MJ, Moore VM, Willson KJ, Van Essen P, Priest K, Scott H et al. Reproductive Technologies and the Risk of Birth Defects. *N Engl J Med*. 2012; 366: 1803-1813.
- Maheshwari A, Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharva S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2012; 98(2): 368-377.
- Haouzi D, Assou S, Dechanet C, Anahory T, Dechaud H, De Vos J, et al. Controlled ovarian hyperstimulation for In Vitro Fertilization alters endometrial receptivity in Humans: Protocol effects. *Biol Reprod*. 2010; 82(4): 679-686.
- Munné S, Fischer J, Warner A, Chen S, Zouves C, Cohen J. Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study. *Fertil Steril*. 2006; 85(2): 326-332.
- Mondadori AG, Ducatelli ME, Mincman J, Gallo A, Coco F, Coco R. PGD by aCGH and qf\_PCR in a couple with recurrent aneuploidies. *JBRA Assist Reprod*. 2012; 16(5): 290-300.